

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071152037

UDC _____

厦门大学

硕士学位论文

探针熔解分析检测结核分枝杆菌耐药突变

Detection of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* with
Probe Melting Analysis

张轶

指导教师姓名: 李庆阁 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2010 年 6 月

论文答辩时间: 2010 年 7 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2010 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘 要	1
Abstract	3
第一章 探针熔解分析检测结核分枝杆菌利福平耐药突变	5
第一节 引 言	5
1.1 结核分枝杆菌流行病学研究	5
1.2 结核分枝杆菌利福平耐药机制	6
1.3 结核分枝杆菌基因分型技术	7
1.4 探针熔解分析方法	8
第二节 材料与方法	8
2.1 样品来源	8
2.2 基因组 DNA 提取	9
2.3 检测用引物、探针的设计	9
2.4 探针靶序列考察	9
2.5 引物筛选及实时 PCR 体系构建	10
2.6 灵敏度分析	10
2.7 特异性分析	10
2.8 不均一耐药检测能力分析	11
2.9 探针熔解分析法检测 1753 份标本	11
2.10 DNA 测序分析	11
第三节 结果与分析	11
3.1 探针熔解分析检测结核分枝杆菌利福平耐药突变实时 PCR 体系的原理	11
3.2 探针靶序列区分效果考察	13
3.3 灵敏度实验	14
3.4 特异性实验	15
3.5 不均一耐药检测能力分析	16
3.6 1753 份样本的检测	17
第四节 讨论	31
第二章 探针熔解分析检测结核分枝杆菌氟喹诺酮类耐药突变	33
第一节 引言	33
1.1 结核分枝杆菌氟喹诺酮类药物耐药机制及检测方法	33
第二节 材料与方法	34
2.1 样品来源	34
2.2 基因组 DNA 提取	35

2.3 检测用引物、探针的设计.....	35
2.4 探针靶序列考察.....	35
2.5 引物筛选及实时 PCR 体系构建.....	36
2.6 灵敏度分析.....	36
2.7 特异性分析.....	36
2.8 不均一耐药检测能力分析.....	37
2.9 探针熔解分析法检测 1753 份标本.....	37
2.10 DNA 测序分析.....	37
第三节 结果与分析	37
3.1 探针熔解分析检测结核分枝杆菌氟喹诺酮类药物耐药突变实时 PCR 体系的原理.....	37
3.2 探针靶序列区分效果考察.....	38
3.3 灵敏度实验.....	39
3.4 特异性实验.....	40
3.5 不均一耐药检测能力分析.....	41
3.6 1753 份标本的检测.....	42
第四节 讨论	47
参考文献	48
致 谢	53

CONTENTS

Abstract (In Chinese).....	1
-----------------------------------	----------

Abstract (In English)	3
------------------------------------	----------

Chapter I : Detection of Rifampin-resistant Mycobacterium

tuberculosis with Probe Melting Analysis	5
---	----------

Section I Introduction.....	5
------------------------------------	----------

1.1 Epidemiology of Mycobacterium tuberculosis	5
--	---

1.2 The mechanism of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis.....	6
---	---

1.3 Molecular methods to detect rifampin resistance	7
---	---

1.4 Probe Melting Analysis.....	8
---------------------------------	---

Section II Materials and Methods.....	8
--	----------

2.1 Sample selection	8
----------------------------	---

2.2 Extraction of genomic DNA	9
-------------------------------------	---

2.3 Primers and probes.....	9
-----------------------------	---

2.4 Thermal denaturation analysis for probes.....	9
---	---

2.5 Real-time PCR assay.....	10
------------------------------	----

2.6 Sensitivity	10
-----------------------	----

2.7 Specificity	10
-----------------------	----

2.8 Detection of heteroresistant sample	11
---	----

2.9 Detection of 1753 samples.....	11
------------------------------------	----

2.10 Sequencing.....	11
----------------------	----

Section III Results	11
----------------------------------	-----------

3.1 Principle of Detection of Rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis with Probe Melting Analysis	11
--	----

3.2 Results of thermal denaturation analysis for probes	13
---	----

3.3 Results of sensitivity	14
----------------------------------	----

3.4 Results of specificity.....	15
---------------------------------	----

3.5 Results of heteroresistant sample.....	16
--	----

3.6 Results of 1753 samples.....	17
----------------------------------	----

Section IV Discussion.....	31
-----------------------------------	-----------

Chapter II: Detection of Fluoroquinolones-resistant Mycobacterium

tuberculosis with Probe Melting Analysis	33
---	-----------

Section I Introduction.....	33
------------------------------------	-----------

1.1 The mechanism of fluoroquinolones resistance in Mycobacterium tuberculosis	33
---	----

Section II Materials and Methods.....	34
--	-----------

2.1 Sample selection	34
2.2 Extraction of genomic DNA	35
2.3 Primers and probes.....	35
2.4 Thermal denaturation analysis for probes.....	35
2.5 Real-time PCR assay.....	36
2.6 Sensitivity	36
2.7 Specificity	36
2.8 Detection of heteroresistant sample	37
2.9 Detection of 1753 samples	37
2.10 Sequencing.....	37
Section III Results	37
3.1 Principle of Detection of fluoroquinolones-resistant Mycobacterium tuberculosis with Probe Melting Analysis	37
3.2 Results of thermal denaturation analysis for probe.....	38
3.3 Results of sensitivity	39
3.4 Results of specificity	40
3.5 Results of heteroresistant sample.....	41
3.5 Results of 1753 samples.....	42
Section IV Discussion	47
References	48
Acknowledgment.....	53

摘 要

本论文建立了一种利用实时 PCR 结合探针熔解分析技术对结核分枝杆菌耐药突变进行快速检测的方法。由于结核分枝杆菌生长速度的限制，目前临床上用于检测结核分枝杆菌对药物敏感性的方法一般需要数周的时间，不利于临床的诊断和治疗。因此，临床上迫切需要一种能够快速准确地检测结核分枝杆菌耐药性的方法。

研究工作包括两个部分：双管双色实时荧光 PCR 探针熔解分析法快速检测结核分枝杆菌利福平耐药突变，实时荧光 PCR 探针熔解分析法快速检测结核分枝杆菌氟喹诺酮类药物耐药突变。

第一部分：在结核分枝杆菌利福平耐药分离株中，95%的突变发生在利福平耐药相关基因 *rpoB* 上的 507-533 密码子（共 81bp）的耐药决定区，因此我们选择根据该区域序列设计实验。通过筛选特异性好，扩增效率高的引物同时结合不对称 PCR 技术达到扩增大量单链的目的；同时筛选可覆盖所有主要突变位点，且分型效果好的探针，通过熔解曲线过程中探针与扩增产物杂交后熔点的不同以区别野生型与突变型。首先通过人工合成靶序列初步考察探针区分野生型与突变型的能力，后经实际样本检测考察体系的分型能力，并收集大量具有药敏结果的临床分离株以验证体系的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值、总准确度等指标，从而建立起一个快速、准确、经济的结核分枝杆菌利福平耐药检测体系。

第二部分：在结核分枝杆菌氟喹诺酮类药物耐药分离株中，42~85%的突变发生在氟喹诺酮类药物耐药相关基因 *gyrA* 上的长度为 320bp 的耐药决定区，根据该区域序列设计实验。通过筛选引物以达到较高的扩增效率，提高检测的灵敏度；通过设计可覆盖所有主要突变位点的探针，通过熔解曲线过程中探针与扩增产物杂交后熔点的不同以区分野生型与突变型。由于 *gyrA* 中的 95 位点存在多态性，人工合成靶序列合成了具有 95 位点多态性及不具有 95 位点多态性的两组，通过靶序列检测及实际样本检测，筛选分型能力好的探针，并检测大量标本以验证体系的灵敏度、特异性、阳性预测值、总准确度等指标，从而建立起一个快速、

准确、经济的结核分枝杆菌氟喹诺酮类药物耐药检测体系。

本论文的方法可缩短结核分枝杆菌耐药检测所需的时间,对结核耐药的早期诊断及指导临床医生用药有重大意义。

关键词: 利福平; 氟喹诺酮类; 耐药; 实时 PCR

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

This paper developed a real-time PCR technology combined with probe melting curve analysis for rapid screening of rifampin and fluoroquinolone-resistant. Current clinical assays for determining antibiotic susceptibility in *M.tuberculosis* require several weeks to be completed due to the slow growth of the bacilli, so the clinical diagnosis was hampered by delayed laboratory diagnosis.

The dissertation consist of two parts: Detection of rifampin resistance in dual tube with dual-color probe; Detection of fluoroquinolone resistance in in a single tube with modified molecular beacon.

The first part reports a sensitive and specific assay that takes less than 3h and reliably identifies rifampin-resistant *M.tuberculosis*. 95 percent of mutations associated with rifampin resistance occur in an 81-bp core region of the bacterial RNA polymerase gene, *rpoB*. All mutations that occur within this region result in rifampin resistance. Four different probes are used in dual reaction tubes, each perfectly complementary to a different target sequence within the 81-bp, and two of them were labeled with FAM, the other two were labeled with TET. Together, their target sequences encompass the region of interests. After the probe melting analysis, the melting temperature of the mismatch hybrid probe-target oligonucleotide is lower than the match one, and different mismatched bases have different melting temperature. So we can define wild type and distinguish different mutant type. Totally 1753 samples were tested, and the results were consistent with the DNA sequencing.

The second part developed a probe melting analysis for rapid screening of fluoroquinolone drug resistance in *M.tuberculosis*. 42~85 percent of mutations associated with fluoroquinolone resistance occur in quinolone resistance-determining region in the *gyrA*. Missense mutations in codon 88,90,91,94 of *gyrA* are associated with resistance to FQs. A polymorphism at *gyrA* codon 95 is not associated with FQ resistance. We design a probe to encompass the region of interests. Totally 1753 samples were tested, and the results were consistent with the DNA sequencing.

Our method is low cost and more rapid than drug susceptibility testing, can be

used for early detection and treatment of drug-resistant tuberculosis.

Keywords: Rifampin; Fluoroquinolones; Drug resistance; Real-time PCR

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 探针熔解分析检测结核分枝杆菌利福平耐药突变

第一节 引言

1.1 结核分枝杆菌流行病学研究

结核病一种通过空气传播的慢性传染病，是人类已知的最古老的疾病之一，目前已成为全球最为关注的重大公共卫生问题之一。20 世纪 50 年代以来，由于科学技术的进步与发展，人类发明了卡介苗（BCG）以及多种可以结核病的化学药物，使得结核病的流行在一定程度上得到了控制。然而由于艾滋病，耐药菌株以及人口流动等多种原因，该病的发病率又逐渐上升，导致结核病在 20 世纪 90 年代后在世界范围内死灰复燃。

根据世界卫生组织的统计，目前世界上总共有三分之一的人口已感染结核杆菌，每秒钟就有一人新感染结核杆菌。据世界卫生组织 2009 年全球结核病控制报告显示，全球现有 1370 万结核病患者，每年发病人数为 927 万，每年死亡人数 177 万，发病人数占前五位的国家分别为印度、中国、印度尼西亚、尼日利亚和南非。我国是世界上结核病高负担国家之一，居全球第二位。根据 2000 年全国结核病流行病学调查结果，中国现有活动性肺结核患者约 450 万。目前，每年新发活动性肺结核约 150 万例，每年约有 13 万人死于结核病，而且耐药情况严重，给结核病的预防和治疗构成严峻挑战。

世卫组织推荐用于治疗结核病的一线药物包括异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇和吡嗪酰胺。二线药物有氟喹诺酮类（氧氟沙星、斯帕沙星和加替沙星）、氨基糖苷类（卡那霉素、阿米卡星）和多肽类抗生素（卷曲霉素、紫霉素和恩维霉素）、D-环丝氨酸和硫脲类抗生素（乙硫异烟胺、丙硫异烟胺）。其中二线药物相比一线药物疗效差且毒性大，用于耐药结核的治疗。

耐药性产生的起因是在对药物敏感的结核病患者的治疗过程中，不恰当的使用了抗菌素。结核分枝杆菌的自发突变很普遍，单一使用某一种药物治疗容易出现耐药的情况。耐多药结核（MDR-TB）界定为至少对异烟肼和利福平（两种最有效的抗结核药物）具有耐药性的结核杆菌引起的疾病。广泛耐药结核

(XDR-TB)是指在耐多药结核的基础上对二线药物中的氟喹诺酮类药物以及对三种二线抗结核注射剂(卷曲霉素、卡那霉素、丁胺卡那霉素)中的至少一种耐药。

近几年耐多药/广泛耐药结核病的出现和蔓延严重阻碍了我国结核病防治工作的进程,已成为严重的公共卫生和社会问题^[1]。2007—2008 年全国结核病耐药基线调查显示:全国肺结核病患者的单耐药率 21%,多耐药为 8.32%,广泛耐药率为 0.68%,总耐药率 37.79%。据此估计,中国现有耐药结核病患者 56 万,占到世界耐药结核病患者 1/4;每年新发耐多药肺结核病患者约 12 万,其中广泛耐药肺结核病患者近 1 万。除了巨大的基数,中国耐药结核病的分布亦非常广泛。耐多药结核的分布以农村为主、青壮年占的比例较高,无明显性别差异,且东、中、西部不同地区耐药率并无显著差异。

1.2 结核分枝杆菌利福平耐药机制

利福平(rifampin, RFP)为利福霉素类半合成广谱抗菌药,该药对结核分枝杆菌和部分非结核分枝杆菌(包括麻风分枝杆菌等)在宿主细胞内外均有明显的杀菌作用。该药物自 1971 年发明以来,一直是结核化疗方案中的关键药物。利福平的作用机制是通过与依赖 DNA 的 RNA 聚合酶的 β 亚单位牢固结合,抑制细菌 RNA 的合成,防止该酶与 DNA 连接,从而干扰转录的开始,阻断 RNA 延伸过程,使 DNA 和蛋白的合成停止。编码 β 亚单位的基因被命名为 *rpoB*。结核分枝杆菌利福平耐药菌株中,95%在 *rpoB* 基因利福平耐药决定区(RRDR)内存在突变,突变一般发生在 507-533 共 27 个氨基酸密码子(81bp)区域内,形式包括点突变,插入及缺失,其中以点突变最为常见,突变率较高的位点有 531, 526, 516 等^[2-5]。其中常见突变位点的频率及类型见图 1-1^[6,7]及 1-2。

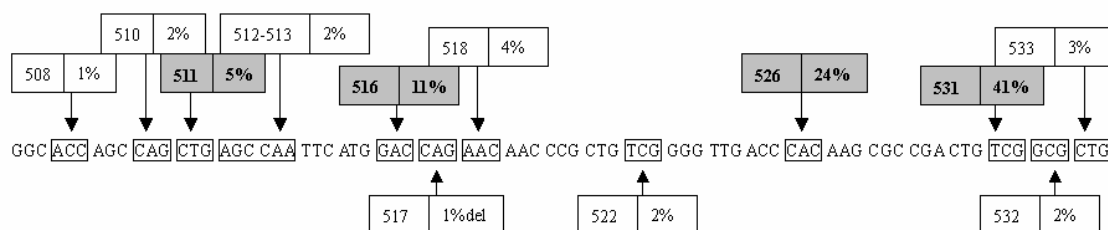


Figure 1-1: Frequencies of mutations on the strands of the 81-bp *M. tuberculosis* *rpoB* core region.

507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533
GGC	ACC	AGC	CAG	CTG	AGC	CAA	TTC	ATG	GAC	CAG	AAC	AAC	CCG	CTG	TCG	GGG	TTG	ACC	CAC	AAG	CGC	CGA	CTG	TCG	GCG	CTG
GAC	CCC			CCG	AGG	CCA	TTG	ATT	TAC	CAC	GAC			CCG	TTG	GCG			GAC				CGG	TTG	GCA	CCG
GGT	AGC			CGG		AAA		GTG	GGC		CAC				CCG				AAC					TGG		CTT
				ATG		CTA			GAA		AGC								CGC					TAC		CAG
									GTC		TAC								CTC							
									GCC										TAC							
									AAA										CCC							
																			GCC							
																			ACC							

Figure 1-2: Mutation type on the strands of the 81-bp *M. tuberculosis* *rpoB* core region.

1.3 结核分枝杆菌基因分型技术

由于需要及时为结核病患者制定出合理的治疗方案,我们必须找到一种快速准确地检测结核分枝杆菌耐药情况的方法^[8]。现有的检测方法可分为表型检测和基因检测两大类^[9,10]。表型检测中的药物敏感性试验(Drug susceptibility testing, DST)以及噬菌体生物扩增法已应用于临床,但这些方法各有其局限性。由于结核分枝杆菌生长缓慢,常规药敏检测方法至少需要 6-8 周才能得到结果。BACTEC TB-460 液体培养基药敏检测方法虽然速度较快,但需昂贵的设备及培养基,且易受杂菌污染。噬菌体生物扩增法^[11]操作复杂,受干扰因素多,因此目前的表型检测难以快速高效地给出耐药结果。

由于结核分枝杆菌利福平耐药主要与 *rpoB* 基因突变有关^[12],因此基因检测法更为直接,近年来也得到了较快发展^[13]。基因检测法通过对耐药相关基因的扩增及序列分析,可以较快的给出耐药信息,甚至可以在几小时内给出结果^[14]。目前已有的分析方法有线性探针杂交法^[15-17],单链多态性分析法(SSCP)^[18],DNA 直接测序法^[19-22],限制性片段长度多态性分析,高分辨熔解曲线法^[23,24]以及芯片检测^[25,26]等^[27,28]。上述方法在检出率以及通量上各有不同,但是共同的缺点是有 PCR 后处理过程,这就使得检测步骤繁琐,且增加了引起 PCR 产物污染的几率。目前较有应用前景的试剂盒有比利时 Innogenetics 公司的 INNO-LiPA Rif.TB 试剂盒^[29]以及德国 Hain 公司的 GenoType MTBDRplus assay 试剂盒^[30],其中后者覆盖位点较多,在利福平耐药突变检测上性价比很高。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库